

La cassiicoline, seul facteur de virulence de *Corynespora cassiicola* chez l'hévéa ?

IFC
Michelin
SOCFIN
SIPH

Marine Déon¹, Daniel Bieysse², Angélique Berger³, Thierry Leroy³, Patricia Roeckel-Drevet⁴, Valérie Pujade-Renaud¹

1. CIRAD UMR-DAP, Université Blaise Pascal, Bât. BVR, laboratoire PIAF, 24 avenue des landais, BP 80026, 63177 Aubière. 2. CIRAD UMR-BGPI, TA 41/K, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5. 3. CIRAD UMR-DAP, TA A96/03, Avenue Agropolis, 34398 cedex 5. 4. Université Blaise Pascal, UMR-PIAF, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière.

Introduction

La production de caoutchouc naturel par *Hevea brasiliensis* est menacée par une maladie foliaire (« *Corynespora* Leaf Fall Disease »), provoquée par le champignon ascomycète *Corynespora cassiicola*. Ce pathogène est capable d'infecter une très large gamme d'espèces végétales avec néanmoins une spécificité d'hôte¹. Une toxine protéique nommée cassiicoline a été caractérisée^{2,3} à partir d'une souche des Philippines (CCP) pathogène de l'hévéa. La toxine purifiée est capable de reproduire les symptômes de la maladie, avec le même spectre d'hôte que la souche dont elle est issue³. Nous présentons ici le clonage du gène codant pour la cassiicoline et son analyse comparative pour 4 souches d'origine géographique et d'agressivité variables, afin de tester l'existence potentielle d'autres facteurs de virulence.

Clonage du gène

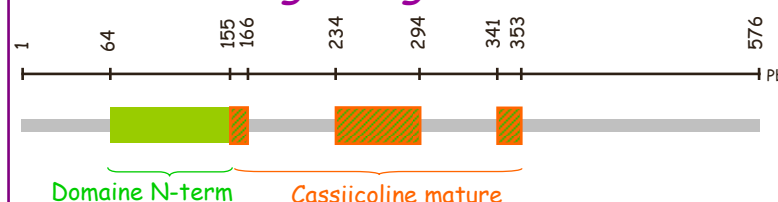


Fig.1: Structure du gène précurseur de la cassiicoline

Le clonage du gène a été réalisé par PCR à l'aide d'amorces dégénérées définies d'après la séquence protéique de la toxine. Le gène complet a été obtenu par amplification des extrémités 3' et 5' par marche chromosomique.

Ce gène code pour une protéine de 58 acides aminés organisée en 2 domaines: une partie N-terminale constituée de 31 aa dont 18 codent pour un peptide signal et une partie C-terminal de 27 aa codant pour la cassiicoline mature.

Analyse de 4 souches

La détection du gène de cassiicoline a été réalisée sur 4 souches cultivées en milieu liquide, par PCR à l'aide de différents couples d'amorces, et par hybridation de type Southern. Le niveau d'expression du gène a été évalué par RT-PCR semi-quantitative. Enfin la toxicité des filtrats de culture a été testée sur feuilles d'hévéa détachées.

Souches	Origine	Détection gène de cas			Expression RT-PCR	Phytotoxicité du filtrat de culture
		PCR	Southern blot	Cas Isoforme		
CCP	Philippines	Oui*	Oui	Oui	++	+++
CCAM1	Cameroun	Non	Non	Oui	Nd	+
CCAM3	Cameroun	Oui*	Oui	Oui	+	+
CSRI5	Sri Lanka	Non	Non	Oui	Nd	+

* Séquences nucléiques identiques à 100%.

Cas: cassiicoline, Nd: non détecté

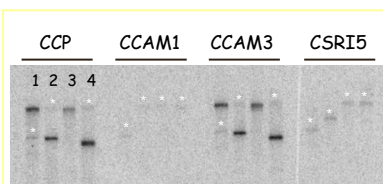


Fig.2: Southern blot

Enzymes de restriction: 1, EcoRI; 2, HindIII; 3, XhoI; 4, BamHI. Sonde radio marquée (P32): ADNc correspondant au domaine mature de la cassiicoline. Lavages: 0.5x SSC, 0.1% SDS

Les bandes faibles (*) qui sont observées pour les 4 souches pourraient correspondre à une isoforme divergente de la cassiicoline.

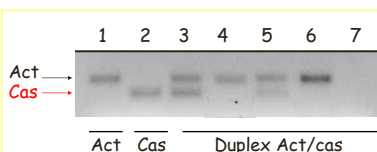


Fig.3: RT-PCR semi-quantitative
Souches CCP (1, 2 et 3), CCAM1(4), CCAM3 (5), Sri5 (6); témoin négatif (7). Amplification à l'aide d'amorces spécifiques de la cassiicoline (cas) ou de l'actine (act), séparément ou en duplex à 21 jours.

Une plus forte expression du gène de cassiicoline est observée pour la souche CCP par rapport à la souche CCAM3.

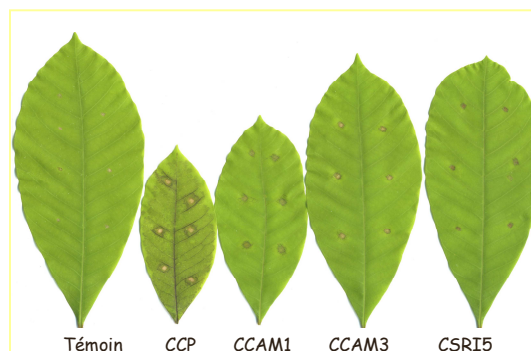


Fig.4: Phytotoxicité des filtrats de culture

De gouttes (20 µl) de filtrat de culture de 14j sont déposées sur feuilles d'hévéa détachées (clone IRCA 707), après grattage de la cuticule. Les symptômes sont observés après 72h.

Une phytotoxicité est observée pour les 4 souches: très forte pour CCP et faible mais significative pour CCAM1, CCAM3 et CSRI5

Conclusion

La cassiicoline n'est pas le seul facteur de virulence de *C. cassiicola* chez l'hévéa. Une isoforme divergente de la toxine pourrait également contribuer à la phytotoxicité du champignon, seule ou en combinaison avec la cassiicoline (Fig.2 et 4). De plus, la virulence du pathogène pourrait être modulée par des mécanismes de régulation transcriptionnelle du gène de cassiicoline (Fig.3). Cette analyse sera étendue à une plus large collection de souches de différentes origines géographiques afin d'étudier plus finement la corrélation entre facteurs de virulence et races physiologiques.